

# راهنمای کیت

## MTHFR-677 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۳/۱

جهت تشخیص جهش MTHFR (C677T) به روش Real-Time PCR  
جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne  
مخصوص تحقیقات

 24 (Cat# MTHFR677RQ24)

 48 (Cat# MTHFR677RQ48)

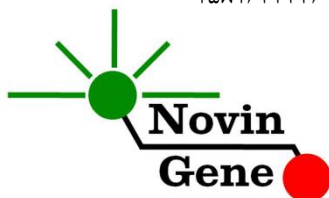
 96 (Cat# MTHFR677RQ96)

 NG-WI-ASL-21-301

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶



## فهرست مندرجات:

۱. مقدمه.....	۳
۲. حیطه کاربرد.....	۳
۳. اطلاعات زمینه ای.....	۳
۴. اساس آزمایش.....	۴
۵. محتویات کیت.....	۴
۶. مدل های بسته بندی.....	۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت.....	۵
۸. محدودیت کاربرد.....	۵
۹. سایر موارد مورد نیاز.....	۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم.....	۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگه داری و انتقال آن.....	۷
۱۲. عوامل مزاحم.....	۷
۱۳. کنترل داخلی.....	۸
۱۴. استخراج DNA.....	۸
۱۵. دستور کار PCR و مراحل آزمایش.....	۸
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها.....	۹
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۹
۱۸. تنظیم دستگاه StepOne.....	۱۱
۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۱۱

۱۲.....	۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene
۱۴.....	۲۱. آنالیز نتایج StepOne
۱۶.....	۲۲. روش امحاء
۱۷.....	۲۳. پشتیبانی فنی
۱۷.....	۲۴. اطلاعات تماس
۱۷.....	۲۵. منابع
۱۸.....	۲۶. توضیحات برچسب

## ۱. مقدمه

کیت MTHFR-677 RQ جهت تشخیص جایگزینی MTHFR C677T در DNA انسانی به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، توالی مورد نظر در نمونه DNA بیمار به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

## ۲. حیطه کاربرد

کیت MTHFR-677 RQ امکان تشخیص جایگزینی C677T در ژن MTHFR در DNA انسانی را به روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

## ۳. اطلاعات زمینه‌ای

MTHFR نام اختصاری آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (Methylenetetrahydrofolate reductase) می‌باشد که در تنظیم متابولیسم فولات (folate) و هموسیستئین (homocysteine) نقش دارد. جایگزینی C677T در ژن این آنزیم، فعالیت آن را به میزان ۳۰ تا ۶۵٪ کاهش می‌دهد. جایگزینی A1298C نیز باعث کاهشی حدود ۱۵ تا ۳۰٪ در فعالیت این آنزیم می‌شود. لذا این جایگزینی‌ها از مهم‌ترین عوامل ژنتیکی موثر بر میزان هموسیستئین خون و متابولیسم آن محسوب می‌شوند و در نتیجه با طیف وسیعی از بیماری‌ها مرتبط می‌گردند. از جمله می‌توان ترومبوز شریانی، تصلب شرائین، بیماری قلبی ناشی از عروق کرونر، نقص لوله عصبی (در دوران جنینی)، انواعی از سرطان، اثرات جانبی برخی داروها و پوکی استخوان را نام برد. البته باید توجه داشت که در موارد فوق اتفاق نظر وجود ندارد و گاهی یافته‌ها

متناقض می باشند. شیوع این جایگزینی در جوامع مختلف متفاوت است و بین ۴٪ تا ۵۰٪ متغیر می باشد.

## ۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی توالی مورد نظر با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می شود. طی این واکنش ماده ژنتیکی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب های فلورسنت قابل تشخیص می گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می توان وجود توالی مورد نظر را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

## ۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
MTHFR RQ Mix	میکس آماده برای PCR*	۴۸۰ میکرولیتر
ThrmB MM Ctrl	شاهد مثبت هموزیگوت	۱۰۰ میکرولیتر
ThrmB WM Ctrl	شاهد مثبت هتروزیگوت	۱۰۰ میکرولیتر
ThrmB WW Ctrl	شاهد منفی (هموزیگوت سالم)	۱۰۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

\* یک، دو یا چهار تیوب، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

## ۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست و چهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

## ۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند. از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود. همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

## ۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج میگردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده شود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی باشد.

## ۹. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

## ۱۰. احتیاط و نکات لازم

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.

- هنگام استفاده مواد کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب‌های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

## ۱.۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت نیم میلی لیتر خون کامل (Peripheral blood) می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه در زمان‌های طولانی‌تر، آن را به حجم‌های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای بیست درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می‌ماند.

## ۱.۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی‌باشد.

مقادیر بالای بیلی‌روبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش



مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

### ۱۳. کنترل داخلی

هر فرد حامل ژن طبیعی یا جهش یافته MTHFR و یا هر دوی آن‌ها می‌باشد. بنابراین همیشه باید نتیجه این آزمایش دست کم برای یکی از انواع طبیعی یا جهش یافته ژن مثبت باشد. در نتیجه این آلل‌ها خود به عنوان کنترل داخلی این آزمایش عمل می‌کنند. در صورتی که فردی برای هر دو آلل طبیعی و جهش یافته منفی باشد، واکنش ناموفق بوده و آزمایش باید تکرار شود.

### ۱۴. استخراج DNA

برای استخراج از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

### ۱۵. دستور کار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله‌ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آن‌ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از یکنواخت شدن آن‌ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه‌ها، چهار لوله نیز برای شاهد های مثبت و منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از **MTHFR RQ Mix** و سپس ۵ میکرولیتر از

**DNA نمونه و یا شاهد** یا آب اضافه کنید و درپوش لوله‌ها را ببندید. سپس

آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.  
توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی  
سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.  
توجه: هنگام استفاده از دستگاه *Rotor-Gene*، رینگ محافظ را نیز در پایان  
اضافه کنید.

توجه داشته باشید تعیین ژنوتایپ نمونه ها تنها در صورتی ممکن خواهد بود که  
هر چهار شاهد *MM*، *WM*، *WW* و آب یا شاهد بدون *DNA* در آزمایش استفاده  
شده باشند!

#### ۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

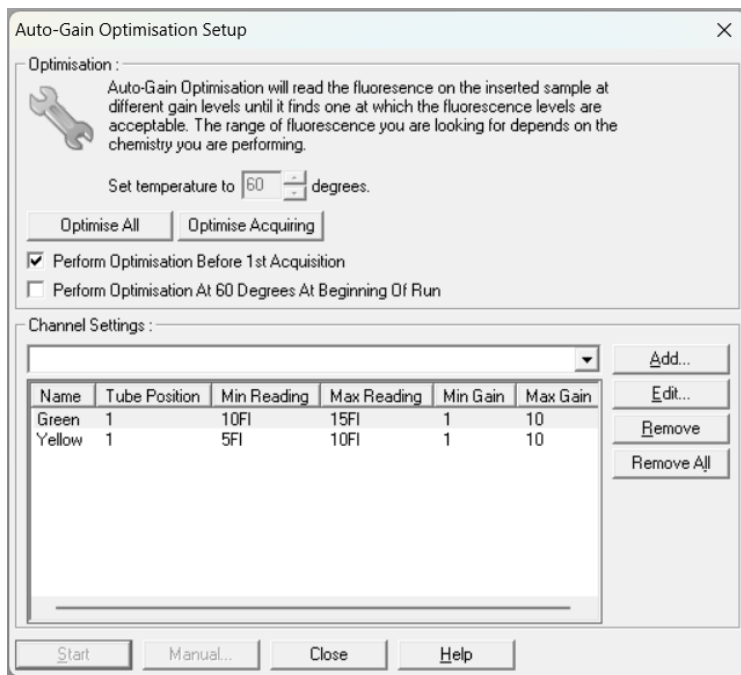
کیت *MTHFR 677 RQ* جهت کار با دستگاه های *StepOne*، *Rotor-Gene* و  
*MIC* طراحی شده است.

#### ۱۷. تنظیم دستگاه *Rotor-Gene*

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!  
دستگاه *Rotor-Gene* را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن  
را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.  
فایل تمپلیت *MTHFR C677T* را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید  
(همچنین قابل دسترس از طریق اسکن *QR Code* روی جعبه کیت). توجه  
فرمایید فایل *MTHFR 677 0.1* یا *MTHFR 677 0.2* را با توجه به نوع لوله  
استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه *View*،  
سپس *Gain Optimisation* را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در *Auto-Gain*  
*Optimisation Setup* ابتدا گزینه *Optimise Acquiring* را بزنید. تنظیمات را

دقیقا مطابق تصویر زیر برای هر دو کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس MTHFR 677 باشد). گزینه **Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition** را فعال کنید و پنجره را ببندید.



در منوی بالای صفحه بر روی دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز بر روی دکمه استارت کلیک کنید و فایل را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان **type**، برای نمونه بیمار unknown و برای شاهدها **Positive Control** و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید **NTC** یا **Negative Control** را انتخاب کنید.

## ۱۸. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.\*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید. (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. شاهدهای مثبت و منفی و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. شاهدها و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را اضافه کنید و نام نمونه ها را مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

## ۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	58°C x 40 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۵۸ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

PCR Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

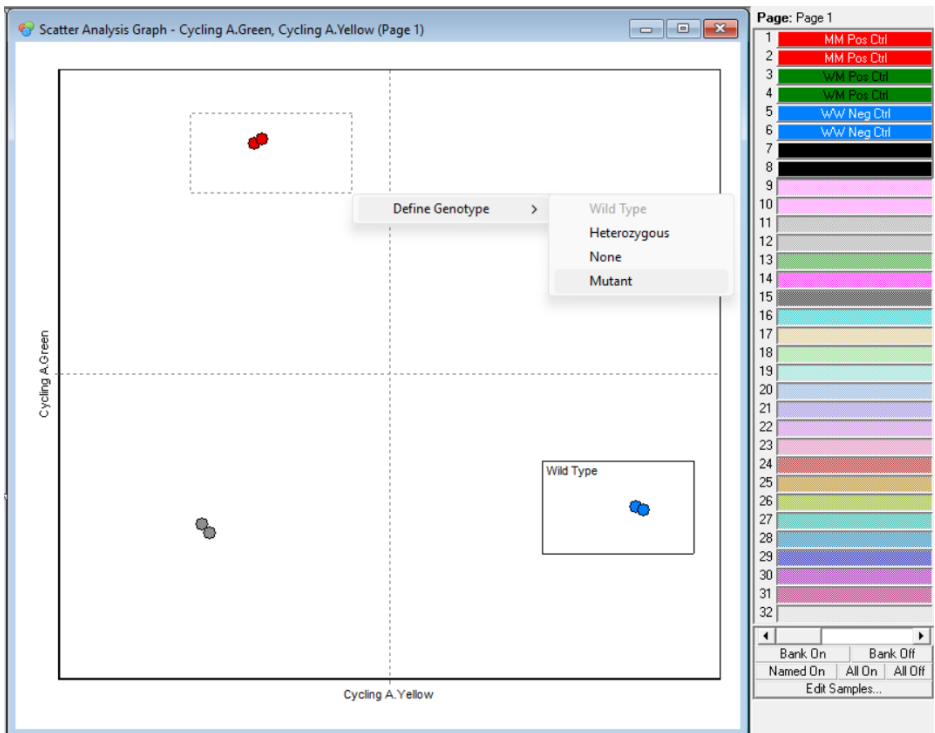
## ۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis گزینه other و سپس Scatter Graph Analysis را انتخاب کنید. سپس با استفاده از دکمه Ctrl هر دو کانال Green و Yellow را انتخاب کرده و بر روی گزینه Show کلیک کنید.

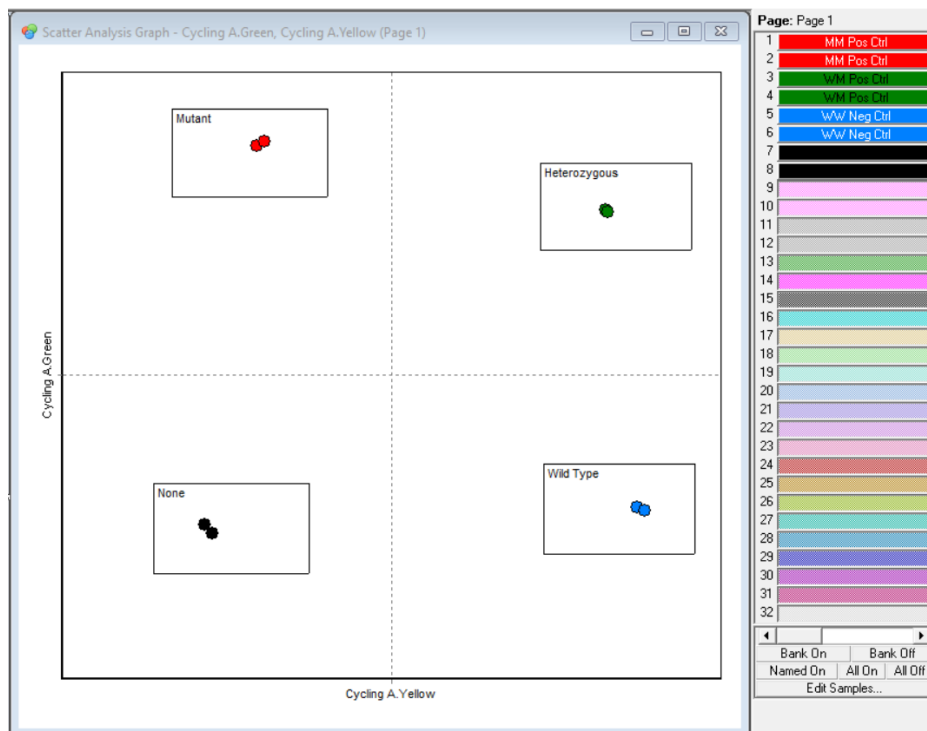
**توجه داشته باشید که تشخیص ژنوتایپ نمونه ها در صورتی ممکن است که هر سه شاهد کیت در آزمایش استفاده شده باشند!**

در پنجره های آنالیز، در قسمت سمت چپ پایین، نمودار پراکندگی نمونه ها را ملاحظه خواهید کرد؛ هر نقطه معرف یکی از نمونه ها می باشد. محور عمودی میزان فلورسانس سبز و محور افقی میزان فلورسانس زرد را نشان می دهد. توجه داشته باشید که کانال سبز به آلل Mutant یا M و کانال زرد به آلل طبیعی Wild type یا W اختصاص دارد. تابش سبز برای نمونه های هموزیگوت Mutant یا MM چند برابر تابش زرد می باشد و این نمونه ها در ناحیه چپ و بالای نمودار یا شمال غربی تجمع پیدا می کنند. در مقابل، تابش زرد برای نمونه های سالم یا WW چند برابر تابش سبز است و این نمونه ها در سمت راست و پایین نمودار یا جنوب شرقی مشاهده خواهند شد. در نمونه های هتروزیگوت WM یا WZ تابش سبز و زرد تقریباً متناسب بوده و این نمونه ها در سمت راست و بالای نمودار یا شمال شرقی قرار می گیرند. نهایتاً نمونه بدون DNA یا نمونه آب دارای تابش سبز و زرد اندکی بوده و این نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار یا جنوب غربی دیده می شوند. اکنون برای تعیین ژنوتایپ نمونه ها، نواحی بالا را باید روی نمودار مشخص کنید. به این منظور ابتدا تمامی نمونه ها را خاموش کنید و تنها شاهد های مثبت و منفی را در وضعیت نمایش نگه دارید. سپس همزمان با نگه داشتن کلیک چپ در اطراف هر شاهد یک مستطیل ترسیم کنید. این مستطیل ها بیانگر همان نواحی هستند که در بالا شرح داده شدند.

هنگام ترسیم هر یک از آن ها ژنوتایپ شاهد را نیز در گزینه Define Genotype که بر روی صفحه می آید انتخاب کنید (تصویر یک).  
 پس از مشخص کردن و تعریف نواحی ذکر شده؛ می توانید علاوه بر شاهدها سایر نمونه ها را نیز روشن کنید تا ژنوتایپ هر نمونه بر اساس پراکندگی آن در اطراف هر شاهد و با توجه به موقعیت آن در نواحی بالا نمایش داده شود (تصویر دو).



تصویر ۱. تعریف ژنوتایپ های شاهدهای تست در دستگاه Rotor-Gene



تصویر ۲. نمایش چگونگی پراکندگی انواع نمونه ها در نمودار Rotor-Gene

توجه! در صورتی که موقعیت شاهدها در نمودار با نمودار نمونه در این راهنما متفاوت باشد؛ یا در صورتی که نواحی ژنوتایپ ها با هم همپوشانی داشته باشند آزمایش باید تکرار شود. همچنین در صورتی که یک نمونه خارج از نواحی تعریف شده بالا قرار بگیرد باید مجدداً آزمایش شود!

## ۲.۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه بر روی

دکمه Analysis کلیک کرده و سپس گزینه Allelic Discrimination را انتخاب کنید. نرم افزار دستگاه با مقایسه فلورسانس نمونه ها و شاهد ها، ژنوتایپ نمونه ها را تعیین می کند.

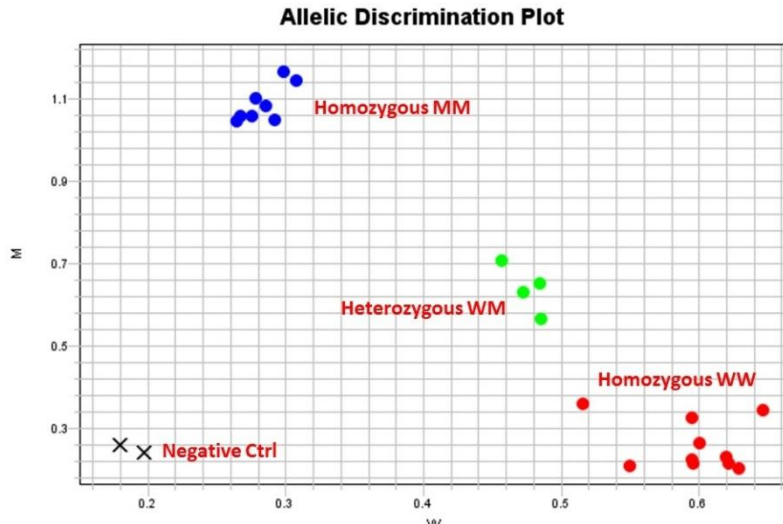
**توجه داشته باشید که نرم افزار دستگاه تنها در صورتی می تواند ژنوتایپ نمونه ها را تشخیص دهد که هر سه شاهد کیت و آب یا شاهد فاقد DNA در آزمایش استفاده شده باشند!**  
**همچنین در نظر داشته باشید در قسمت Setup آلل های MM، WM و WW باید تعریف شده باشد.**

برای ملاحظه نمودار مورد انتظار شاهد ها به تصویر سه مراجعه کنید. هر نقطه معرف یکی از نمونه ها می باشد. ژنوتایپ شاهد ها و نمونه ها همچنین با رنگ نقاط نیز از هم تفکیک شده اند. هموزیگوت Mutant یا MM با آبی، هموزیگوت سالم یا WW با قرمز، هتروزیگوت یا WM با سبز، و نهایتا نمونه شاهد بدون DNA با رنگ سیاه نشان داده می شوند. ضربدر (x) سیاه نیز نشانگر نمونه ای می باشد که ژنوتایپ آن قابل شناسایی نبوده است.

در هر نمودار محور عمودی میزان فلورسانس FAM و محور افقی میزان فلورسانس VIC را نشان می دهد. توجه داشته باشید که کانال FAM به آلل Mutant یا M و کانال VIC به آلل طبیعی یا W اختصاص دارد. تابش FAM برای نمونه های هموزیگوت Mutant یا MM چند برابر تابش VIC می باشد و این نمونه ها در ناحیه چپ و بالای نمودار یا شمال غربی تجمع پیدا می کنند. در مقابل تابش VIC برای نمونه های سالم یا WW چند برابر تابش FAM است و این نمونه ها در سمت راست و پایین نمودار یا جنوب شرقی مشاهده خواهند شد. در نمونه های هتروزیگوت یا WM تابش FAM و VIC تقریبا متناسب بوده و این نمونه ها در سمت راست و بالای نمودار یا شمال شرقی قرار می گیرند. نهایتا نمونه بدون DNA یا نمونه آب دارای تابش FAM و VIC اندکی بوده و این



نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار با جنوب غربی دیده می شوند (تصویر سه).



تصویر ۳. نمایش چگونگی پراکندگی انواع نمونه ها در نمودار دستگاه StepOne.

توجه! در صورتی که موقعیت شاهد ها در نمودار با آنچه در این راهنما نشان داده شده متفاوت باشد و یا در صورتی که شاهد ها نزدیک به هم و غیر قابل تفکیک باشند آزمایش باید تکرار شود. همچنین در صورتی که نمونه ها با ضربدر (x) سیاه در بین کنترل ها نمایش داده شوند آزمایش باید تکرار شود!

## ۲۲. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می توان آنها را مستقیماً به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول

هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

## ۲۳. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

## ۲۴. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶  
تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com






وبسایت: www.novingene.ir

## ۲۵. منابع

- Leclerc, D., Sibani, S. and Rozen, R., 2005. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. MTHFR polymorphisms and disease, pp.1-20.
- Liew, S.C. and Gupta, E.D., 2015. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology,

- metabolism and the associated diseases. European journal of medical genetics, 58(1), pp.1-10.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3 2004: 190-212.
  - Nihal, U.Ğ.U.Z., Erden, G., Güngör, O., Ceylan, B.A.L., 2012. Determination of the frequency of MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms in persons with polymorphic MTHFR gene. Journal of Clinical and Experimental Investigations, 3(4), pp.472-476.

## ۲۶. توضیحات برچسب

دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید		تولید کننده		جهت مصارف پژوهشی	RUO
تاریخ انقضاء		تعداد <n> آزمون کافی		کدبهر (شماره بچ)	LOT
محدوده دمایی -30°C		شماره سریال	SN	شماره کاتالوگ	REF

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی [www.novingene.ir](http://www.novingene.ir) مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.



# MTHFR-677 RQ

## Kit Manual

Autumn 2025, Version 3.1

For Real-Time PCR Detection of MTHFR (C677T) Variant  
For Research Use Only

 24 (Cat# MTHFR677RQ24)

 48 (Cat# MTHFR677RQ48)

 96 (Cat# MTHFR677RQ96)

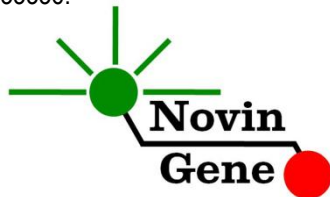
 NG-WI-ASL-23-400

RUO



**NovinGene ParsVira**

No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.



# Table of Contents

1. Introduction .....	3
2. Intended Use .....	3
3. Background Information .....	3
4. Test Principle .....	3
5. Kit Contents .....	4
6. Packaging models .....	4
7. Storage and Stability .....	4
8. Product Use Limitations .....	4
9. Additionally Required Materials .....	5
10. General Precautions .....	5
11. Specimen, Storage and Transport .....	6
12. Interfering Substances .....	6
13. DNA Isolation .....	6
14. Internal Control .....	6
15. PCR Protocol .....	7
16. Devices and software .....	7
17. Programming Rotor-Gene .....	7
18. Programming StepOne .....	9
19. Programming Other Machines .....	9
20. Data Analysis: Rotor-Gene .....	9

21. Data Analysis: StepOne .....	13
22. Disposal Method .....	14
23. Technical Support .....	14
24. Contact Information .....	14
25. References.....	15
26. Symbols .....	16

## **1. Introduction**

MTHFR-677 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting of MTHFR C677T mutation. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit.

This kit is intended for Research Use Only!

## **2. Intended Use**

MTHFR-677 RQ kit is intended for detecting of MTHFR (C677T) variant in human DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

## **3. Background Information**

MTHFR stands for Methylenetetrahydrofolate reductase which is a key regulatory enzyme in folate and homocysteine metabolism. Since, the C677T and A1298C variants show reduced activity (30-65% and 15-30% reduction respectively), these polymorphisms are among the most important genetic determinants of plasma total homocysteine. Due to their influence on homocysteine metabolism, they have been linked to several complex disorders including arterial thrombosis, atherosclerosis, coronary heart disease, neural tube defects, several types of cancer, adverse drug interactions and osteoporosis though, findings are still controversial. Depending on the ethnic background up to 50% of population may carry the variant allele of MTHFR.



## 4. Test Principle

The target sequence is detected using PCR, where primers specific to the target sequence amplify it. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

## 5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

Label	Content	Quantity
MTHFR RQ Mix	PCR Mix*	480 µl
Thrmb MM Ctrl	Homozygous Positive Control	100 µl
Thrmb WM Ctrl	Heterozygous Positive Control	100 µl
Thrmb WW Ctrl	Negative Control	100 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

\*1, 2 or 4 tubes for 24, 48 or 96 reaction kits.

## 6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

## 7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

## 8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.

- The User manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

## 9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

## 10. General Precautions

To prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of templates to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.

- Thaw kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

## 11. Specimen, Storage and Transport

Whole blood (0.5ml) is the preferred sample. Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or Citrate as anticoagulant. Whole blood should be shipped and stored at +4°C (stable for 48 hours). For longer terms, sample should be aliquoted and stored at -20°C or lower for up to a few months.

## 12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.

Elevated levels of bilirubin ( $\leq 4.5$  mg/dl) and lipids ( $\leq 1000$  mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

## 13. Internal Control

Each sample carries wild type, mutant or both alleles of MTHFR. These alleles serve as both the target and the Internal Control of the assay. Any sample should always be positive for at least one of them. If a sample is negative for both alleles, the reaction is inhibited, and the test should be repeated.

## 14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. no. 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany).
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

## 15. PCR Protocol

Thaw the reagents on crushed ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample, plus one for each control and one for the NTC.

**Pipette 20ul of MTHFR RQ Mix directly to each tube followed by adding 5ul of controls, or sample DNA.**

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

*Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.*

*Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring too.*

***Please note that genotype of the samples can be called only if all the four controls provided with kit are used in each test!***

## 16. Devices and software

MTHFR-677 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

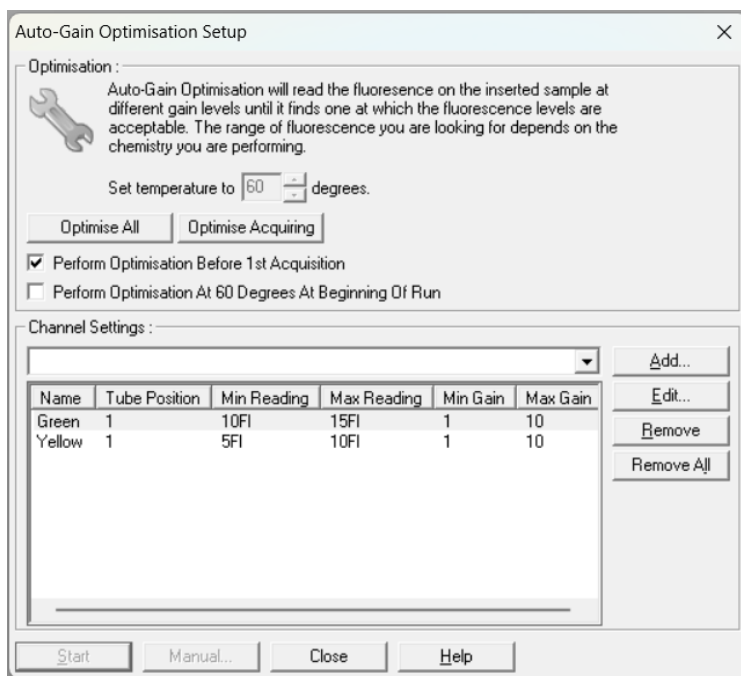
## 17. Programming Rotor-Gene

***- Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!***

## MTHFR-677 RQ (v3.1)

Open the MTHFR C677T template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); MTHFR 677 0.1 is for strip tubes and MTHFR 677 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image.



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the run file. Edit sample names.

## 18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.\*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on "Plate Setup". Controls and a few samples are defined. You may change the plate set up using right click options (copy, past, clear). You may also add or remove samples on "Define Targets and Samples" menu. When finished, click on "Start Run" and save the experiment on the desired location. The instrument will start shortly.

## 19. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	<b>95°C x 3 min</b>	1
2	<b>95°C x 15 sec</b>	45
	<b>58°C x 40 sec</b>	

Fluorescence should be collected at 58°C for FAM and VIC dyes. PCR Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in the reaction.

## 20. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, the Positive controls have been defined as "Positive control". Patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

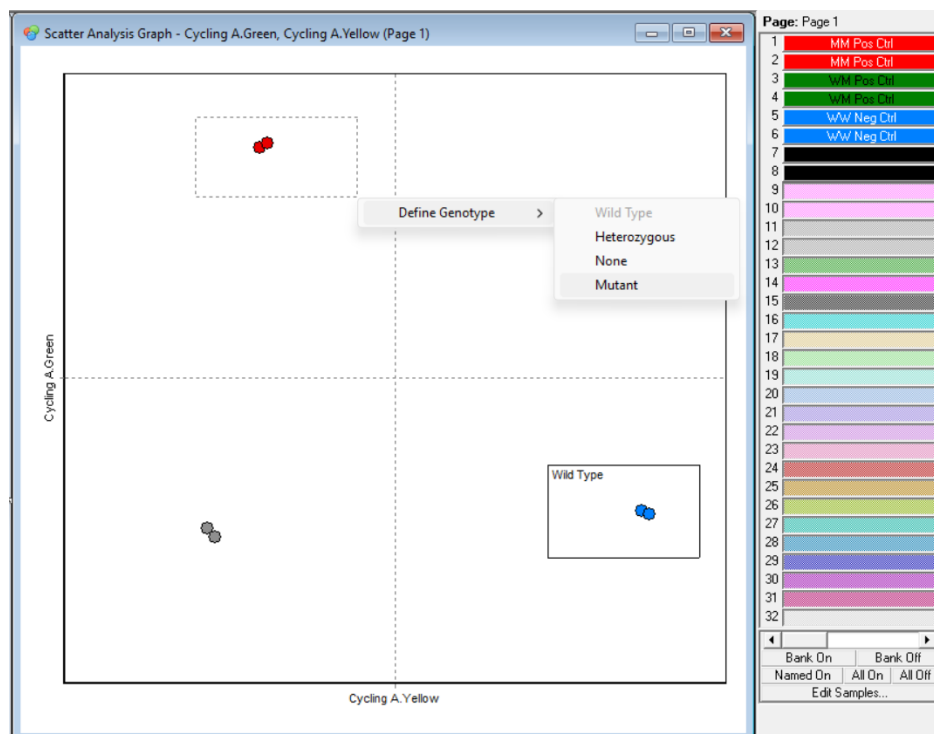
Analyze data according to Rotor-Gene manual. Briefly, click on Analysis menu select "Other" and then "Scatter Graph Analysis". Using Ctrl button, mark both Green and Yellow channels and then click on "Show".

Please note that the device software can only detect the genotype of the samples if all three kit controls and water or a DNA-free control have been used in the test! Also, make sure that in the Setup section, the alleles MM, WM, and WW are defined.

The “Scatter Graph Window” is now shown in the lower left window. Each dot represents one sample. The vertical axis shows the Green fluorescence and horizontal axis is for the Yellow fluorescence. Note that M allele is detected in the Green channel and W allele in Yellow channel.

Therefore, samples are located in four regions of the graph. MM samples with high Green and low Yellow fluorescence gather in upper left; WW samples with low Green fluorescence and high Yellow gather in lower right; WM samples with high Green and high Yellow fluorescence gather in upper right; and finally NTC or control with no DNA gather in lower left with low Green and low Yellow fluorescence.

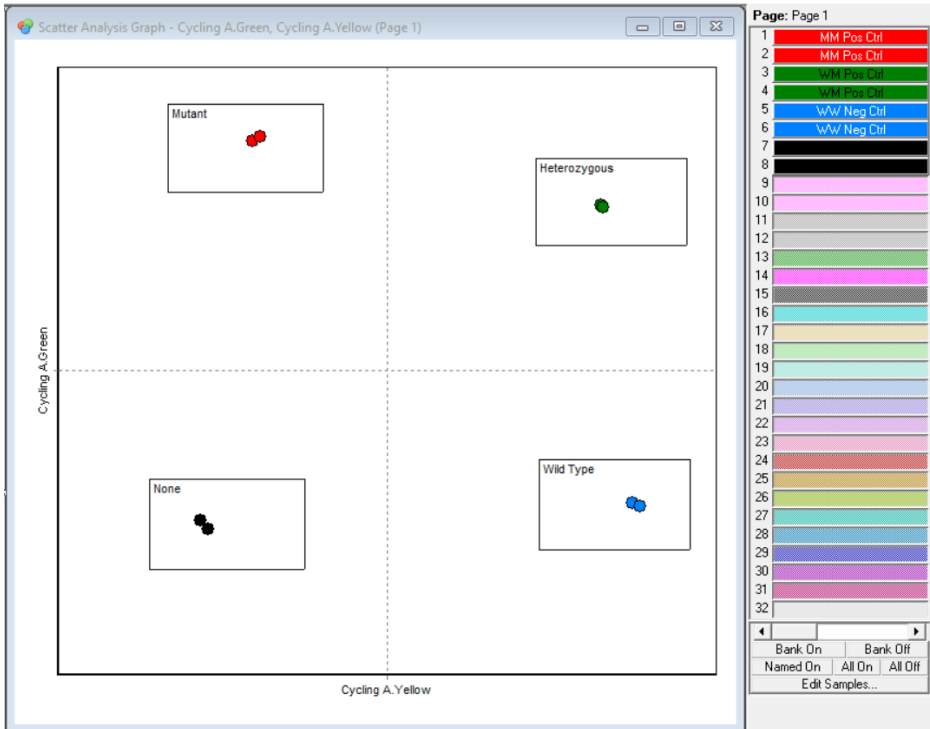
In order to determine genotypes of the samples, the above regions should be defined on the graph. To do so, turn off all the samples except for the negative and positive controls. Then drag a rectangle around each control. Each rectangle represents one of the above-mentioned regions. Label MM genotype region as “Mutant”, WM as “Heterozygous”, WW as “Wild Type” and Negative Control as “None” (Figure 1).



**Fig 1.** Defining genotypes of different controls of the test on Rotor-Gene



Now turn on all the samples and the results are displayed in the tab “Scatter Analysis Results” (Figure 2).



**Fig 2.** Typical scatter graph for controls and samples on Rotor-Gene

**Note!** If the location of controls is not similar to the typical graph represented here; or if any of above regions overlap in a graph, results are not valid, and test should be repeated. Also, if a sample is located in between regions, it should be re-examined!

## 21. Data Analysis: StepOne

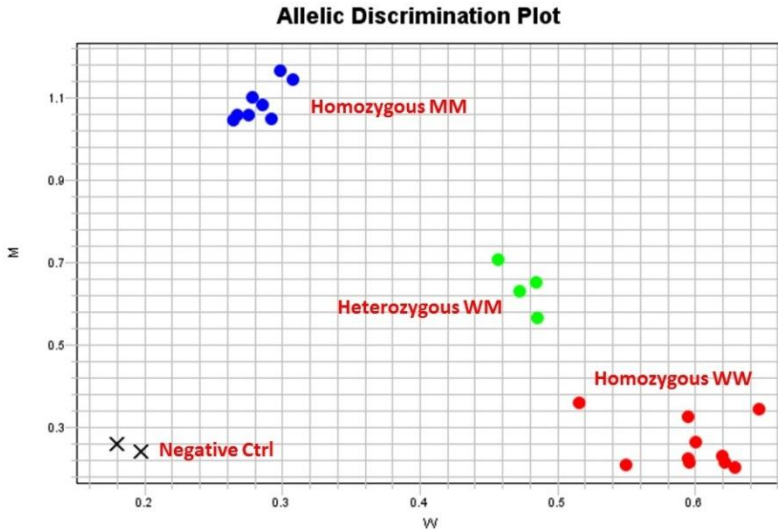
Analyze data according to StepOne Manual. Briefly, click on Analyze and select “Allelic Discrimination” tab. Genotype of the samples are automatically determined by the software based on comparison of their fluorescence with the controls. Please note that the alleles must be defined in the Setup section as MM, WM and WW.

Please note that the device software can only detect the genotype of the samples if all three kit controls and water or a DNA-free control have been used in the test!

please ensure that the alleles MM, WM, and WW are defined in the Setup section.

Figure 3 represents the typical graph. Each dot represents one sample. All samples are color coded based on their genotype as blue for MM, Red for WW, Green for WM, and Black box for control with no DNA or NTC. Unknown samples will be marked with black "×".

Note that the vertical axis shows the FAM fluorescence and horizontal axis is for the VIC fluorescence. Accordingly, M allele is detected in FAM channel and W allele in VIC channel. Therefore, samples are located in four regions of the graph. MM samples with high FAM and low VIC fluorescence gather in upper left; WW samples with low FAM fluorescence and high VIC gather in lower right; WM samples with high FAM and high VIC fluorescence gather in upper right; and finally, NTC or control with no DNA gather in lower left with low FAM and low VIC fluorescence. Genotypes of samples are automatically determined by the software based on comparison with the controls (Figure 3).



**Fig 3.** Typical graph for controls and samples on StepOne

**Note!** If location of controls are not similar to the typical graph represented here; or if controls are located too close to each other in a graph; and if samples lie in between controls and genotypes cannot be called, results are invalid and test should be repeated!

## 22. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

## 23. Technical Support

For technical support, contact us via  
Phone: +98-9936223241  
Email: [info@novingene.com](mailto:info@novingene.com)

## 24. Contact Information

### NovinGene ParsVira

Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Tel: +98 21-88837393

+98 990 -1813124










Email: [info@novingene.com](mailto:info@novingene.com)

Website: [www.novingene.com](http://www.novingene.com)

## 25. References

- Leclerc, D., Sibani, S. and Rozen, R., 2005. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. MTHFR polymorphisms and disease, pp.1-20.
- Liew, S.C. and Gupta, E.D., 2015. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. European journal of medical genetics, 58(1), pp.1-10.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3 2004: 190-212.
- Nihal, U.Ğ.U.Z., Erden, G., Güngör, O., Ceylan, B.A.L., 2012. Determination of the frequency of MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms in persons with polymorphic MTHFR gene. Journal of Clinical and Experimental Investigations, 3(4), pp.472-476.

## 26. Symbols

 <b>RUO</b> Research use only	 <b>Manufacturer</b>	 <b>Consult instructions for use</b>
 <b>LOT</b> Lot number	 <b>Content sufficient for &lt;n&gt; tests</b>	 <b>Use-by date</b>
 <b>REF</b> Catalogue number	 <b>SN</b> Serial number	 <b>Temperature limit</b>

**For more information and resources please visit our website; [www.novingene.com](http://www.novingene.com)**

